

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Oktober 2002 (31.10.2002)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
PCT WO 02/086511 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/68 MOSER, Markus [CH/CH]; Sonnenbergstrasse 28, CH-8610 Uster (CH). OESCH, Bruno [CH/CH]; Haldenstrasse 13, CH-5233 Stilli (CH).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/04341
- (22) Internationales Anmeldedatum: 19. April 2002 (19.04.2002) (74) Anwalt: EMMEL, Thomas; Schaefer & Emmel, Gehölzweg 20, 22043 Hamburg (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, JP, NZ, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (30) Angaben zur Priorität: 101 19 713.6 21. April 2001 (21.04.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PRIONICS AG [CH/CH]; Waigstrasse 27a, CH-8952 Schlieren (CH).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BIFFIGER, Karin [CH/CH]; Hirschengasse 17, CH-5416 Kirchdorf (CH).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR TESTING SAMPLES CONTAINING PRION PROTEIN FOR THE POSSIBLE PRESENCE OF THE PRP^{Sc} FORM

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG VON PRION-PROTEIN ENTHALTENDEN PROBEN AUF DAS EVENTUELLE VORLIEGEN DER PrP^{Sc}-FORM

(57) Abstract: The invention relates to a method for testing samples containing prion protein for the possible presence of the PrP^{Sc} form, according to which: (Step a) the sample is mixed with protease in order to digest protease-sensitive proteins or protein regions; (Step b) after digestion, it is tested whether the sample contains the region PrP 27-30 of the prion protein, which is resistant in the PrP^{Sc} form of the prion protein protease, and the presence of PrP^{Sc} in the sample is established based on the positive detection of PrP 27-30. The inventive method is characterized in that, during Step b, the sample is additionally tested in order to determine whether a complete digestion of the protease-sensitive region of the prion protein has occurred.

(57) Zusammenfassung: Ein Verfahren zur Untersuchung von Prion-Protein enthaltenden Proben auf das eventuelle Vorliegen der PrP^{Sc}-Form, bei dem (Schritt a) die Probe mit Protease versetzt wird zur Verdauung Protease sensibler Proteine bzw. Proteinbereiche, die Probe (Schritt b) nach Verdauung darauf überprüft wird, ob in ihr der Bereich PrP 27-30 des Prion-Proteins enthalten ist, der in der PrP^{Sc}-Form des Prion-Proteins Protease resistent ist und aus dem positiven Nachweis von PrP 27-30 auf das Vorliegen von PrP^{Sc} in der Probe geschlossen wird, ist dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt b) die Probe zusätzlich darauf überprüft wird, ob eine vollständige Verdauung des Protease sensiblen Bereichs des Prion-Proteins stattgefunden hat.

WO 02/086511 A2

Verfahren zur Untersuchung von Prion-Protein enthaltenden Proben auf das
eventuelle Vorliegen der PrP^{Sc}-Form

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruches 1.

Gattungsgemäße Verfahren werden z.Zt. insbesondere bei Screening-Untersuchungen von Säugetieren, z.B. Schlachtvieh, auf übertragbare, degenerative neurologische Erkrankungen angewandt. Solche Erkrankungen, die unter dem Begriff spongiforme Enzephalopatien oder auch Prionerkrankungen zusammengefaßt werden, treten als BSE bei Rindern und z.B. als Scrapies bei Schafen, oder als Kuru oder Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bei Menschen auf.

Wie oben erwähnt sind Prionerkrankungen übertragbar, wobei die Infektiösität noch nicht vollständig geklärt ist. Als einziges mit dem infektiösen Agens assoziiertes Molekül wurde bislang ein krankheitsspezifisches Prion-Protein (PrP^{Sc}) gefunden, das eine abnorme Isoform eines normalen Säugetierproteins (PrP^c) unbekannter Funktion ist. Beide Isoformen PrP^{Sc} und PrP^c stimmen bezüglich Molekulargewicht und Aminosäuresequenz überein. Sie unterscheiden sich in ihrer räumlichen Faltung.

Viele Indizien, insbesondere die Abwesenheit von anderen Molekülen außer PrP^{Sc} im Prion und vor allem die Abwesenheit von Nukleinsäuren, deuten daraufhin, daß PrP^{Sc} wahrscheinlich die zentrale Rolle bei der Auslösung der oben genannten Krankheiten zukommt. Es wird angenommen, daß PrP^{Sc}-Proteine in

der Lage sind, normale PrP^c-Proteine in die krankheitsspezifische Faltung zu konvertieren, was die Infektiosität von PrP^{Sc}-Proteinen erklären würde.

Gattungsgemäße Tests gehen daher von PrP^{Sc} als zentralem Krankheitsmolekül aus und überprüfen, ob das z.B. in einer Hirnprobe eines Säugetiers enthaltene Prion-Protein auch in der PrP^{Sc}-Form vorliegt. Falls ja, wird davon ausgegangen, daß das Säugetier, dem die Probe entnommen wurde, infiziert war.

Dabei enthalten, wie erwähnt, Proben aus infizierten Quellen nicht ausschließlich PrP^{Sc} sondern daneben auch Prion-Protein in der PrP^c-Form. Während des Verfahrens muß also eine Differenzierung zwischen der PrP^c und der eventuell vorliegenden PrP^{Sc}-Form erfolgen.

In diesem Zusammenhang macht man sich zunutze, daß die PrP^c-Form vollständig Protease-verdaubar ist, während bei der PrP^{Sc}-Form nur ein C-terminaler Bereich Protease sensitiv und ein als PrP 27-30 bezeichneter Bereich des Prion-Proteins Protease resistent ist.

Bei herkömmlichen Tests wird daher die zu untersuchende Probe zunächst in einem ersten Schritt (Schritt a) mit einer Protease verdaut, wobei davon ausgegangen wird, daß nach Verdauung in der Probe keine Protease sensitiven Bereiche des Prion-Proteins mehr enthalten sind und bei infektiösem Probematerial nur der Protease resistente Bereich PrP 27-30 der PrP^{Sc}-Form übrig bleibt. Dementsprechend wird nach der Verdauung in einem weiteren Schritt (Schritt b) lediglich überprüft, ob der Bereich PrP 27-30 in der Probe nachzuweisen ist oder nicht. Zum Nachweis werden z.B. spezifische im Bereich PrP 27-30 bindende Antikörper eingesetzt. Eventuell gebildete Antikörper-PrP 27-30-Komplexe werden dann mittels herkömmlicher Methoden z.B. Elisa-Tests (Moynagh und Schimmel; Nature 1999 Jul 8; 400 (6470): 105) nachgewiesen. Ist der Nachweis positiv,

d.h. lassen sich z.B. Antikörper-PrP 27-30 Komplexe nachweisen, so wird davon ausgegangen, daß die Probe PrP^{Sc} enthält und daß der Organismus, aus dem die Probe stammt, infiziert war.

Ein Problem bei den herkömmlichen Tests ist, daß sie mit einem indirekten Nachweis arbeiten. Mit anderen Worten, aus der Tatsache, daß nach der Verdauung ggf. noch PrP 27-30 nachweisbar ist, wird geschlossen, daß es sich um den entsprechenden Protease resistenten Bereich aus PrP^{Sc} handelt, ohne daß die eingesetzte Methode diesen sicher von einem aus PrP^C stammenden Bereich differenzieren kann. Unter ungünstigen Umständen, z.B. bei schwierig zu bearbeitendem Probematerial, kann es theoretisch zu falsch positiven Ergebnissen kommen.

Aufgabe der Erfindung ist es, gattungsgemäße Verfahren so weiterzubilden, daß eine sicherere Aussage möglich ist.

Gelöst wird die Aufgabe mit einem Verfahren, das die kennzeichnenden Merkmale des Anspruches 1 aufweist.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, daß nach dem Verdauungsschritt (Schritt a) die Probe in Schritt b nicht nur darauf überprüft wird, ob in ihr der Bereich PrP 27-30 enthalten ist, sondern zusätzlich geprüft wird, ob in der Probe noch Protease-sensitive Bereiche des Prion-Proteins enthalten sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt damit, gleichzeitig eine Aussage über das eventuelle Vor- bzw. Nichtvorliegen von PrP 27-30 in der verdauten Probe und eine Aussage darüber, ob die Verdauung vollständig war oder nicht.

Der positive Nachweis von PrP 27-30 in einer verdauten Probe wird nur dann als Hinweis auf PrP^{Sc} gewertet, wenn gleichzeitig in der verdauten Probe keinerlei

Protease sensitive Bereiche des Prion-Proteins mehr nachweisbar sind. Lassen sich solche Protease sensitiven Bereiche auch nach Verdauung noch in der Probe nachweisen, so ist der eventuelle Nachweis von PrP 27-30 kein eindeutiger Hinweis auf PrP^{Sc} sondern könnte auch bedeuten, daß ein entsprechende Bereich der PrP^c-Form nicht vollständig verdaut war. In diesem Fall müßte die Probe noch einmal untersucht werden mit z.B. höheren Proteasekonzentrationen oder längeren Verdauungszeiten.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich also falsch positive Untersuchungsergebnisse in besonders sicherer und einfacher Weise ausschließen. Gerade bei seltenen Infektionskrankheiten wie Prionenerkrankungen hängt die Aussagekraft eines Tests wesentlich davon ab, daß falsch positive Resultate minimiert werden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung erfolgt der Nachweis von PrP 27-30 bzw. Protease sensibler Bereiche des Prion-Proteins mittels spezifisch in den jeweiligen Bereichen am Prion-Protein-bindenden Molekülen, die im folgenden als Molekül A (spezifisch für einen Protease-sensitiven Bereich) und Molekül B (spezifisch für den Bereich PrP 27-30) bezeichnet werden sollen.

Ein übliches Verfahren gemäß dieser Ausgestaltung sieht vor, daß in Schritt a die Verdauung der Probe erfolgt und in Schritt b die Moleküle A und B der verdauten Probe zugesetzt werden und überprüft wird, ob sich in der Probe Komplexe aus dem Prion-Protein mit dem Molekül A und/oder B gebildet haben. In Abhängigkeit davon, ob und welche Komplexe sich gebildet haben, erfolgt dann die Auswertung.

Lassen sich nur Komplexe aus Molekül B und Prion-Protein nachweisen, so enthält die Probe PrP^{Sc}. Liegen zusätzlich Komplexe vor, die das Molekül A enthal-

ten, so besteht die Gefahr eines falsch positiven Ergebnisses. Lassen sich keine Komplexe oder nur Komplexe mit Molekül A finden, so ist die Probe negativ.

Als Moleküle A und B können insbesondere Antikörper (im folgenden mit Antikörper A und B bezeichnet), die spezifisch die entsprechenden Bereiche des Prion-Proteins erkennen, eingesetzt werden. Genauso gut ist es aber auch möglich, daß andere spezifisch bindende Moleküle z.B. RNA-Moleküle eingesetzt werden.

Antikörper, die PrP 27-30 erkennen, sind ausführlich beschrieben und dokumentiert. Es wird daher an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen.

Antikörper die den Protease-sensitiven N-terminalen Bereich des PrP erkennen sind z.B. aus "Brain Research, 545, (1991) 319-321 (Antiserum anti-PrP-N), "Brain Pathol. 2002; 12: 1-11 (Antikörper FH11, BG4)", "Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 95 pp. 8812-8815, Juli 1998 (Antikörper 5B2)" oder "Biochemical and Biophysical Research Communications 273, 136-139 (2000) (Antikörper 8B4)" bekannt. Die genannten Veröffentlichungen beschreiben die Eigenschaften der Antikörper sowie ihre Herstellung.

Der Nachweis der gebildeten Komplexe kann standardmäßig erfolgen. Zumeist ist vorgesehen, daß eine der beiden Komponenten des gebildeten Komplexes trägergebunden ist.

Denkbar ist z.B., daß das Probematerial nach Verdauung z.B. an einer Mikrotiterplatte oder an Beads immobilisiert wird und eine Detektion mit markierten Molekülen A und B, insbesondere Antikörpern A und B, vorgenommen wird. Die

vorzugsweise eingesetzten Antikörper können in einem Ansatz gleichzeitig oder nacheinander mit dem Probematerial inkubiert werden. Genausogut ist es möglich zwei parallele Ansätze durchzuführen, in denen jeweils einer der beiden Antikörper A oder B zugesetzt wird.

Denkbar ist natürlich auch, die Moleküle A und B, bevorzugt die Antikörper A und B, jeweils auf Chips zu immobilisieren, die in Abhängigkeit von einer an ihrer Oberfläche erfolgenden molekularen Interaktion ein meßbares Signal erzeugen. Solche Chips sind aus der EP 887645 bekannt. Werden solche Chips, an die jeweils z.B. Antikörper A bzw. B immobilisiert sind, mit dem nach Verdauung erhaltenen Probematerial inkubiert, so läßt sich auf einfache Weise messen, z.B. anhand der optischen Lichtbrechung, ob das Probematerial von den auf den Chips immobilisierten Antikörpern gebunden wurde oder nicht.

Bevorzugt wird zum Nachweis ein Sandwichimmunoassay durchgeführt. Grundsätzlich kommen bei solchen Sandwichimmunoassays jeweils zwei Antikörper pro Analyt zum Einsatz, die an zwei unterschiedliche Epitope des Analyten gebunden werden. Einer der Antikörper ist in der Regel immobilisiert und dient zur Kopplung des Analyten an eine Festphase, während der andere als Detektionsantikörper dient und mit einer Markierung versehen ist.

Im vorliegenden Fall wird in diesem Zusammenhang neben den Antikörpern A und B, die die unterschiedlichen Bereiche des PrP erkennen, zusätzlich noch ein weiterer Antikörper C vorgesehen, der PrP 27-30 erkennt, wobei allerdings das von diesem Antikörper C erkannte Epitop ein anderes ist als das von Antikörper B erkannte.

Es gibt nun eine Reihe unterschiedlicher Möglichkeiten:

Denkbar ist Antikörper C auf einem Träger zu immobilisieren, den Träger dann mit dem nach Verdauung erhaltenen Probematerial zu inkubieren und dann zur Detektion markierte Antikörper A und B zuzusetzen.

Eine andere Möglichkeit ist, die Antikörper A und B auf einem Träger zu immobilisieren und dann nach Inkubation des Trägers mit dem Probematerial zur Detektion markiertem Antikörper C zuzusetzen.

Im Hinblick auf die erforderliche Auflösung der Signale, auf eine Standardisierung und auch generell im Hinblick auf Probleme, die mit einer Triplekinetik einhergehen, könnten die beiden letztgenannten Varianten mit Problemen verbunden sein.

Diesen Problemen kann man dadurch begegnen, daß man die Reaktionen trennt, z.B., daß man die Antikörper auf unterschiedlichen Trägern immobilisiert und die Inkubationen in unterschiedlichen Ansätzen durchführt.

Denkbar ist gemäß einer besonders bevorzugten Ausgestaltung aber auch, daß das nach Verdauung erhaltene Probematerial in einem Ansatz zuerst mit immobilisierten Antikörpern A und dann mit immobilisierten Antikörpern B inkubiert wird. Zur Detektion wird wie oben beschrieben markierter Antikörper C zugeetzt. Bei dieser Ausgestaltung erreicht man durch die zeitliche Staffelung auf einfache Weise, daß eventuell vorhandene Protease-sensitive Bereiche des PrP zunächst an die spezifischen Antikörper A binden können, ohne daß die Bindungskinetik durch einen gleichzeitigen Angriff der als Molekül B dienenden Antikörper auf den Protease-resistenten Bereich gestört wird.

Denkbar ist z.B. die Probe nacheinander mit Beads zu versetzen, die mit den betreffenden Antikörpern markiert sind, oder den Ansatz mit einer Einrichtung durchzuführen, bei der das Probematerial im Durchfluß nacheinander mit räumlich getrennten Bereichen in der Einrichtung kontaktiert wird, in denen jeweils die Antikörper A bzw. B immobilisiert sind.

Wie oben angesprochen, erfolgt der Nachweis eventuell gebildeter Komplexe mittels markierter Moleküle, insbesondere markierter Antikörper. Läßt sich auf einem Träger eine Markierung nachweisen bzw. erkennen, so ist dies ein Zeichen, daß der betreffende mit der nachgewiesenen Markierung versehene Antikörper gebunden wurde, was in Abhängigkeit von dem Testaufbau ein Indiz für das Vorliegen eines bestimmten Komplexes gewertet werden kann.

Die Moleküle A und B, bzw der Antikörper C können mit z.B. gleichen oder unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen oder mit Enzymen (Elisa) bzw. mit anderen geeigneten Markierungen markiert sein. Grundsätzlich sind alle Markierungen geeignet, die sich direkt oder indirekt nachweisen bzw. messen lassen. Die unterschiedlichen Möglichkeiten, Moleküle insbesondere Antikörper in geeigneter Weise für obige Verfahren zu markieren und im Rahmen der Verfahren nachzuweisen sind dem Fachmann bekannt. Es soll daher an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Untersuchung von Prion-Protein enthaltenden Proben auf das eventuelle Vorliegen der PrP^{Sc}-Form, bei dem

a) die Probe mit Protease versetzt wird zur Verdauung Protease sensibler Proteine bzw. Proteinbereiche,

b) die Probe nach Verdauung darauf überprüft wird, ob in ihr der Bereich PrP 27-30 des Prion-Proteins enthalten ist, der in der PrP^{Sc}-Form des Prion-Proteins Protease resistent ist und

c) aus dem positiven Nachweis von PrP 27-30 auf das Vorliegen von PrP^{Sc} in der Probe geschlossen wird,

dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt b) die Probe zusätzlich darauf überprüft wird, ob eine Verdauung des Protease sensiblen Bereichs des Prion-Proteins stattgefunden hat.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Schritt b) die Probe mit an das Prion-Protein bindenden Molekülen A und B versetzt wird, wobei Molekül A in einem Protease sensiblen Bereich des PrP-Proteins bindet, und Molekül B im Bereich PrP 27-30 bindet, und eventuell in der Probe gebildete Komplexe aus Prion-Protein und den Molekülen A und/oder B nachgewiesen werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die in Schritt b) eingesetzten Moleküle A und/oder B Antikörper sind.

4. Verfahren nach ein Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Nachweis der gebildeten Komplexe aus Prion-Protein und den Molekülen A und B in einem Sandwichimmunoassay erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Probe nach Verdauung zuerst mit immobilisierten als Moleküle A dienenden Antikörpern, dann mit immobilisierten als Moleküle B dienenden Antikörpern in Kontakt gebracht wird, und dann mit einem markiertem PrP 27-30 erkennenden Antikörper eventuell gebildete Komplexe aus Prion-Protein und immobilisierten Antikörper nachgewiesen werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-4, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Schritt b) zunächst die Probe in zwei Ansätze aufgeteilt wird und jedem der Ansätze dann jeweils die Moleküle A oder B zugesetzt werden.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Oktober 2002 (31.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/086511 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: **G01N 33/68**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP02/04341**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
19. April 2002 (19.04.2002)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
101 19 713.6 21. April 2001 (21.04.2001) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **PRIONICS AG** [CH/CH]; Waigstrasse 27a, CH-8952 Schlieren (CH).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BIFFIGER, Karin** [CH/CH]; Hirschengasse 17, CH-5416 Kirchdorf (CH). **MOSER, Markus** [CH/CH]; Sonnenbergstrasse 28, CH-8610 Uster (CH). **OESCH, Bruno** [CH/CH]; Haldenstrasse 13, CH-5233 Stilli (CH).
- (74) Anwalt: **EMMEL, Thomas**; Schaefer & Emmel, Gehölzweg 20, 22043 Hamburg (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): **AU, CA, JP, NZ, US.**
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): **europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).**
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: **24. Juli 2003**
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **METHOD FOR TESTING SAMPLES CONTAINING PRION PROTEIN FOR THE POSSIBLE PRESENCE OF THE PRP^{Sc} FORM**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR UNTERSUCHUNG VON PRION-PROTEIN ENTHALTENDEN PROBEN AUF DAS EVENTUELLE VORLIEGEN DER PRP^{Sc}-FORM**

(57) Abstract: The invention relates to a method for testing samples containing prion protein for the possible presence of the PrP^{Sc} form, according to which: (Step a) the sample is mixed with protease in order to digest protease-sensitive proteins or protein regions; (Step b) after digestion, it is tested whether the sample contains the region PrP 27-30 of the prion protein, which is resistant in the PrP^{Sc} form of the prion protein protease, and the presence of PrP^{Sc} in the sample is established based on the positive detection of PrP 27-30. The inventive method is characterized in that, during Step b, the sample is additionally tested in order to determine whether a complete digestion of the protease-sensitive region of the prion protein has occurred.

(57) Zusammenfassung: Ein Verfahren zur Untersuchung von Prion-Protein enthaltenden Proben auf das eventuelle Vorliegen der PrP^{Sc}-Form, bei dem (Schritt a) die Probe mit Protease versetzt wird zur Verdauung Protease sensibler Proteine bzw. Proteinbereiche, die Probe (Schritt b) nach Verdauung darauf überprüft wird, ob in ihr der Bereich PrP 27-30 des Prion-Proteins enthalten ist, der in der PrP^{Sc}-Form des Prion-Proteins Protease resistent ist und aus dem positiven Nachweis von PrP 27-30 auf das Vorliegen von PrP^{Sc} in der Probe geschlossen wird, ist dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt b) die Probe zusätzlich darauf überprüft wird, ob eine vollständige Verdauung des Protease sensiblen Bereichs des Prion-Proteins stattgefunden hat.

WO 02/086511 A3